

一株永生化的口腔癌相关成纤维细胞系的建立及鉴定

https://doi.org/10.12307/2022.558

陈盛¹, 杨艳¹, 丁亮², 叶传进¹, 张磊¹, 夏舒¹, 李慧玲¹, 黄晓峰¹

投稿日期: 2021-03-18

采用日期: 2021-04-12

修回日期: 2021-11-01

在线日期: 2021-11-30

中图分类号:

R459.9; R318; R78

文章编号:

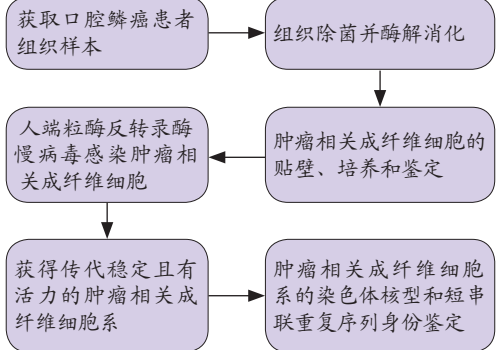
2095-4344(2022)24-03808-06

文献标识码: B

文章快速阅读:

文章特点—

- (1) 收集口腔鳞癌患者手术标本, 对肿瘤组织中的肿瘤相关成纤维细胞进行分离、培养、纯化和鉴定;
- (2) 利用包装有人端粒酶反转录酶的慢病毒感染原代肿瘤相关成纤维细胞, 永生化成纤维细胞标志物没有显著改变, 细胞增殖速率明显优于非永生化成纤维细胞, 未见明显衰老;
- (3) 成功建立了口腔癌来源的永生化成纤维细胞系, 为研究口腔鳞状细胞癌肿瘤微环境提供稳定的实验材料基础。



文题释义:

肿瘤相关成纤维细胞: 是肿瘤基质细胞的主要成分, 又称肌纤维母细胞、癌旁成纤维细胞、反应性纤维母细胞、癌相关成纤维细胞。相较于长梭形的静息状态成纤维细胞, 肿瘤相关成纤维细胞体积较大、排列方式杂乱、呈纺锤形、细胞核呈锯齿状、细胞浆中收缩细丝或张力纤维丝增加, 可通过自分泌或旁分泌细胞因子的形式作用于肿瘤细胞, 或通过直接与肿瘤细胞直接接触, 参与肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移等重要病理过程。

摘要

背景: 肿瘤相关成纤维细胞系是构成肿瘤微环境的重要细胞成分, 但是在原代培养过程中极易老化和表型丢失, 进而显著降低肿瘤相关成纤维细胞功能相关研究的实验重复性。

目的: 旨在建立一种永生化的口腔癌相关成纤维细胞系, 为探索口腔癌中肿瘤相关成纤维细胞功能提供稳定的细胞实验材料。

方法: 采用酶消化法分离、纯化人口腔癌组织来源肿瘤相关成纤维细胞, 利用包装有人端粒酶反转录酶(pBABE-hygro-hTERT)的慢病毒感染原代肿瘤相关成纤维细胞, 鉴定其形态及其标志物, 然后进行细胞增殖、衰老功能检测, 对原代和永生化肿瘤相关成纤维细胞进行染色体核型分析、细胞系身份鉴定。

结果与结论: ①成纤维细胞永生化后, 其标志物 α -SMA、PDGFR β 以及FSP-1表达没有发现显著改变; ②即使在传代15代后, 永生化成纤维细胞的增殖速率明显优于非永生化成纤维细胞; ③ β -半乳糖苷酶染色结果显示: 随着细胞代数增加, 与非永生化成纤维细胞相比, 永生化成纤维细胞未见明显衰老; ④永生化成纤维细胞染色体核型仍保留正常细胞的基本特征, 而未发生恶性转化; ⑤短串联重复序列鉴定结果显示, 永生化成纤维细胞为原代细胞, 与已知细胞数据库信息均无重合; ⑥以上结果说明, 成功建立了口腔癌来源的永生化成纤维细胞系, 为口腔癌肿瘤微环境研究提供进一步的实验基础。

关键词: 肿瘤相关成纤维细胞; 口腔鳞癌; 原代细胞; 永生化细胞系; 细胞衰老; 染色体核型鉴定

Establishment and identification of an immortalized oral cancer-related fibroblast line

Chen Sheng¹, Yang Yan¹, Ding Liang², Ye Chuanjin¹, Zhang Lei¹, Xia Shu¹, Li Huiling¹, Huang Xiaofeng¹

¹Department of Pathology, ²Central Laboratory, Affiliated Stomatological Hospital of Medical School of Nanjing University, Nanjing 210000, Jiangsu Province, China

Chen Sheng, Technician-in-charge, Department of Pathology, Affiliated Stomatological Hospital of Medical School of Nanjing University, Nanjing 210000, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Huang Xiaofeng, MD, Chief physician, Master's supervisor, Department of Pathology, Affiliated Stomatological Hospital of Medical School of Nanjing University, Nanjing 210000, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: Cancer-associated fibroblasts are important cell components that constitute the tumor microenvironment, but they are prone to aging and phenotype loss during the primary culture, which greatly reduces the experimental reproducibility of cancer-associated fibroblasts function-related research.

南京大学医学院附属口腔医院, ¹ 病理科, ² 中心实验室, 江苏省南京市 210000

第一作者: 陈盛, 男, 1982年生, 安徽省滁州市人, 汉族, 主管技师, 主要从事口腔颌面肿瘤方面的研究。

通讯作者: 黄晓峰, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 南京大学医学院附属口腔医院病理科, 江苏省南京市 210000

https://orcid.org/0000-0003-2120-4443 (陈盛)

基金资助: 国家青年科学基金项目(81902754), 项目负责人: 丁亮; 江苏省自然科学基金项目(BK20190304), 项目负责人: 丁亮

引用本文: 陈盛, 杨艳, 丁亮, 叶传进, 张磊, 夏舒, 李慧玲, 黄晓峰. 一株永生化的口腔癌相关成纤维细胞系的建立及鉴定 [J].

中国组织工程研究, 2022, 26(24):3808-3813.



OBJECTIVE: To establish an immortalized oral cancer-related cancer-associated fibroblast line and provide stable experimental cells for exploring the function of cancer-associated fibroblasts in oral cancer.

METHODS: Enzymatic digestion method was used to isolate and purify cancer-associated fibroblasts from human oral cancer tissues, and the lentivirus packaged with human telomerase reverse transcriptase (hTERT) (pBABE-hygro-hTERT) was used to infect primary cancer-associated fibroblasts; and their morphology and markers were identified; cell proliferation and aging functions were tested. Furthermore, chromosome karyotype analysis and short tandem repeat analysis were performed on primary cancer-associated fibroblasts and immortalized cancer-associated fibroblasts for cell line identification.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) After fibroblasts were immortalized, the expression levels of their markers α -SMA, PDGFR β and FSP-1 were not significantly changed. (2) Even after 15 passages, their proliferation rate was significantly better than that of non-immortalized cells. (3) The results of β -galactosidase staining showed that with the increase of cell passage, compared with non-immortalized fibroblasts, immortalized fibroblasts did not present obvious senescence. (4) The karyotype of immortalized fibroblasts still retained the basic characteristics of normal cells without malignant transformation. (5) Short tandem repeat identification results demonstrated that immortalized fibroblasts were primary cells, and there was no overlap with the information in the known cell database. (6) These findings indicate that an immortalized fibroblast line derived from oral cancer has been successfully established, which provides a further experimental basis for studying the tumor microenvironment of oral cancer.

Key words: tumor-associated fibroblasts; oral squamous cell carcinoma; primary cells; immortalized cell lines; cellular senescence; karyotype identification

Funding: National Youth Science Fund Project, No. 81902754 (to DL); Jiangsu Natural Science Foundation, No. BK20190304 (to DL)

How to cite this article: CHEN S, YANG Y, DING L, YE CJ, ZHANG L, XIA S, LI HL, HUANG XF. Establishment and identification of an immortalized oral cancer-related fibroblast line. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(24):3808-3813.

0 引言 Introduction

口腔鳞状细胞癌是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤^[1], 60%的患者在就诊时已处于临床进展的晚期阶段, 且传统手术、放化疗等对晚期患者的治疗效果有限^[2-3]。肿瘤微环境具有异质性, 不同特性的肿瘤细胞、间质细胞以及胞外成分间的信号交流塑造了“种子-土壤”微环境的异质性^[4-5]。肿瘤微环境间质细胞主要包含成纤维细胞、间充质干细胞以及各种免疫细胞, 作者前期研究关注了间充质干细胞与巨噬细胞极化的关系^[6]。近年来有关口腔鳞状细胞癌的研究中, 针对肿瘤相关成纤维细胞的研究有了很大的发展, 肿瘤相关成纤维细胞作为肿瘤微环境中的重要间质细胞类型^[7-9], 通过合成、重塑细胞外基质和产生生长因子来调节肿瘤进展, 影响肿瘤的生长、转移及耐药等多种功能^[10-14]。作者所在团队在口腔癌间质异质性方向上做了许多探索, 前期成功分离、培养并鉴定了口腔鳞癌组织来源的原代成纤维细胞, 通过转录组测序分析, 揭示了肿瘤相关成纤维细胞的来源和转化机制, 并发现间质肿瘤相关成纤维细胞能够直接影响肿瘤生长和靶向治疗疗效^[15-16]。

但是目前关于肿瘤相关成纤维细胞研究过程中的一个重要考虑因素是细胞材料的稳定性, 包括传代稳定性和表型及功能稳定性^[17]。原代细胞在体外培养一段时间后, 细胞便会失去生长、分裂的能力而走向衰老和死亡^[18]。因此, 随着原代肿瘤相关成纤维细胞的传代次数增加, 其衰老程度也显著上升, 增殖能力和促肿瘤进展的能力显著削弱, 而永生细胞能够通过外界因素使细胞不断分裂增殖而达到永生化的状态, 具有多次传代的特性^[19], 能够克服原代细胞只能使用5-8代的实验限制^[20]。目前, 国内成熟的永生口腔癌相关肿瘤相关成纤维细胞系还处于缺乏状态。该研究收集口腔鳞癌患者手术标本, 对肿瘤组织中的肿瘤相关成纤维细胞进行分离、培养、纯化和鉴定, 再利用包装有人端粒酶反转录酶(pBABE-hygro-hTERT)的慢病毒感染原代肿瘤相关成纤维细胞^[21], 旨在建立一株永生化的口腔鳞癌肿瘤相关成纤维细胞系, 为研究口腔鳞状细胞癌肿瘤微环境提供稳定的实验材料基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞实验。

1.2 时间及地点 实验于2019年2月至2021年2月在南京大学医学院附属口腔医院中心实验室完成。

1.3 材料 标本取自南京大学附属南京市口腔医院颌面外科收治的1例口腔癌患者, 女性, 75岁, 鳞状细胞癌I级。在知情同意的情况下, 获取其手术标本。标本抗污染处理约3h, 用250 mL生理盐水(含青霉素160万U)反复冲洗三四次, 浸泡于生理盐水小瓶中。该研究所使用的临床样本均获得南京大学医学院附属口腔医院的伦理审核和患者知情同意批准, 批准编号: 2019NL-009(KS)。

实验主要试剂: 磷酸盐缓冲液(Servicebio, 中国武汉); DMEM培养基、胎牛血清、青霉素/链霉素双抗溶液(Gibco, 美国); FM培养基(ScienCell, 美国); 青霉素/链霉素双抗溶液(Gibco, 澳洲); 无血清细胞冻存液(Bambanker, 日本); 胰蛋白酶(Invitrogen, 美国); I型胶原酶、IV型胶原酶(Biosharp, 中国合肥); 中性蛋白酶(蓝季生物, 中国上海); 透明质酸酶(Sigma, 美国); 组织保存液(Miltenyi Biotec, 德国); Lipofecamine 3000转染试剂、Opit-MEM培养基(Thermo Fisher, 美国); 抗体稀释液(DAKO, 美国); 荧光封固剂(SouthernBiotech, 美国); 鼠抗人PD-L1单克隆抗体(1:200, Proteintech, 美国); 兔抗人 α -SMA单克隆抗体(1:1000, CST, 美国); Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 647)、Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 594) (1:400, Abcam, 英国); CCK-8试剂盒(Thermo Fisher, 美国); β -半乳糖苷酶原位染色试剂盒(RG0039, 碧云天, 中国)。

实验主要仪器: CO₂培养箱(Thermo Fisher, 美国); 超净工作台(苏净安泰公司, 中国苏州); 台式低温高速离心机(HITACH, 日本); 落地式培养摇床(Thermo Fisher, 美国); 光学显微镜(尼康, 日本); 液氮罐(CBS, 美国); 纯水机(Millipore, 美国); 制冰机(安创仪器, 中国苏州); 恒温金属浴(博日, 中国杭州); 细胞爬片(WHB, 中国上海); 免疫共聚焦显微镜(Nikon, 日本)。

1.4 实验方法

1.4.1 肿瘤相关成纤维细胞的培养、纯化 用含 20% 抗生素的 PBS 洗涤口腔鳞癌组织，去除上皮和脂肪组织，然后将样品切成小块并用复合酶（包括胶原酶、中性蛋白酶和透明质酸酶）消化 30 min，将消化后的组织放入 DMEM/F12 基础培养基，置于 37 °C，体积分数为 5%CO₂ 培养箱孵育，每两三天更换 1 次培养基，待细胞长满培养皿后加入 2 mL 胰蛋白酶消化两到三分钟以除去上皮细胞，剩余细胞则是成纤维细胞，待剩余细胞长满培养皿后加入 2 mL 胰蛋白酶进一步消化 2 min，此时获得纯化后的原代成纤维细胞，然后原代细胞按照培养细胞的正常操作步骤进行传代培养，待细胞长满培养皿后进行胰蛋白酶消化、离心、传代或冻存。

肿瘤相关成纤维细胞的培养及鉴定

细胞来源:	人口腔鳞癌组织
原代培养方法:	酶消化法
基础培养基:	DMEM/F12 培养基
添加材料:	基础培养基中加入体积分数 10% 胎牛血清、1% 青霉素、1% 链霉素
原代培养时间:	原代培养两到三天开始换液，之后每 2 d 换液 1 次，待原代细胞长满培养皿后开始传代
细胞传代:	细胞融合至 90%–100% 用含 0.25% EDTA 的胰酶消化传至下一代，以 1 : 2 比例传代，两至三天待细胞长满培养皿后进行后续传代
细胞鉴定:	采用免疫荧光和染色体核型鉴定
伦理学批准:	该实验经过南京大学医学院附属口腔医院伦理委员会批准

1.4.2 肿瘤相关成纤维细胞的永生化 为了建立肿瘤相关成纤维细胞系，利用包装有人端粒酶反转录酶 (pBabe-hygro-hTERT) 的慢病毒感染已经分离得到的原代肿瘤相关成纤维细胞，6 h 后更换成 DMEM/F12 完全培养液，于细胞培养箱内继续培养 24 h，然后加入 150 mg/L 潮霉素进行筛选，每 3 d 更换 1 次培养基，选择培养 12–14 d，直至对照组（加入是阴性对照病毒）细胞全部死亡，将培养液中潮霉素浓度减半继续培养，直至转染细胞出现阳性克隆，胰酶消化后传代培养。

1.4.3 细胞免疫荧光染色鉴定 用无菌玻璃制细胞爬片浸泡于体积分数为 75% 乙醇中至少 24 h，于超净操作台中取出放置于小培养皿中，PBS 冲洗 2 次，再铺于 24 孔板中。常规消化原代成纤维细胞（包括非永生化和永生化成纤维细胞），并用 DMEM/F12 完全培养基重悬至适当浓度 ($1.6 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$)，吹打细胞悬液使得单个细胞率在 95% 以上，每孔加入 500 μL 细胞悬液，均匀接种于 24 孔板内培养过夜，40 g/L 多聚甲醛固定 15 min，吸去多聚甲醛，PBS 冲洗 3 次，每次 5 min，用提前预冷的甲醇于 -20 °C 打孔，15 min 后吸去甲醇，PBS 冲洗 3 次，每次 5 min，3% 牛血清白蛋白封闭 1 h，吸去牛血清白蛋白，4 °C 孵育一抗过夜，一抗分别为 α -SMA、FSP-1 以及 PDGFR β ，PBS 洗去一抗，室温避光孵育荧光二抗一两个小时，PBS 洗去二抗，加入 DAPI 细胞核染色 2 min，PBS 洗去 DAPI，滴加防淬灭剂，用盖玻片封固，共聚焦荧光显微

镜观察、拍照。

1.4.4 细胞增殖 利用 CCK-8 实验检测第 3，6，10，15 代永生化和非永生肿瘤相关成纤维细胞的生长曲线，以每孔 3 000 个细胞种于 96 孔板中，培养 7 d 后每孔加入 10 μL CCK-8，37 °C、体积分数为 5%CO₂ 培养箱中孵育 2 h，使用酶标仪检测 450 nm 波长处吸光度值，连续检测 4 d。重复实验 3 次，取均值。

1.4.5 β -半乳糖苷酶染色 将非永生化和永生化的第 3，6，10，15 代肿瘤相关成纤维细胞以 1.5×10^5 个 / 孔细胞密度接种于 6 孔板，培养 24 h 后吸除细胞培养液，加入 1 mL β -半乳糖苷酶染色固定液，室温固定 10 min，吸除细胞固定液，PBS 洗涤细胞 3 次，每次 3 min，吸除 PBS，每孔加入 1 mL 染色工作液，37 °C 孵育 20 min–2 h 或更长时间，直至部分细胞颜色变蓝，如果孵育时间较长，可以用封口膜或保鲜膜封住 6 孔板防止蒸发，普通光学显微镜下观察。

1.4.6 细胞染色体核型分析 取对数生长的永生化和非永生肿瘤相关成纤维细胞，加入 50 μL 秋水仙素，继续培养 4 h 用吸管轻轻吹打分裂相细胞，1 000 r/min 离心 10 min，吸弃上清液；逐滴加入预热至 37 °C 的 KCl (0.075 mol/L)，每次加入 0.5 mL，共 5 mL，混匀，用吸管轻轻吹打均匀，37 °C 孵育 30 min，用新鲜固定液固定；取 -10 °C 冰冻的载玻片，距玻片 15 cm 高度处向玻片滴 1 滴或 2 滴加入固定液之后的细胞悬液，于室温干燥；4% 吉姆萨溶液染色 20 min，流水冲洗玻片背面，乙醇逐级脱水；二甲苯透明 3 次，中性树脂封固；油镜观察两种细胞染色体的数目及形态特征，并用 Visus2.1 软件进行分析处理。

1.4.7 细胞系鉴定 为了鉴定细胞系身份，进行短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 检测。取适量永生化成纤维细胞和第 3 代非永生化成纤维细胞，应用 Microread Genomic DNA kit 提取 DNA，采用 Coldeneye™ 20A STR 复合扩增试剂盒进行扩增，在 ABI 3100 型遗传分析仪上对短串联重复序列位点和性别基因 Amelogenin 进行检测。

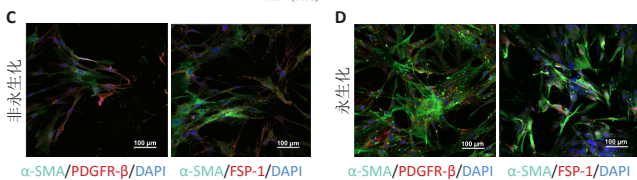
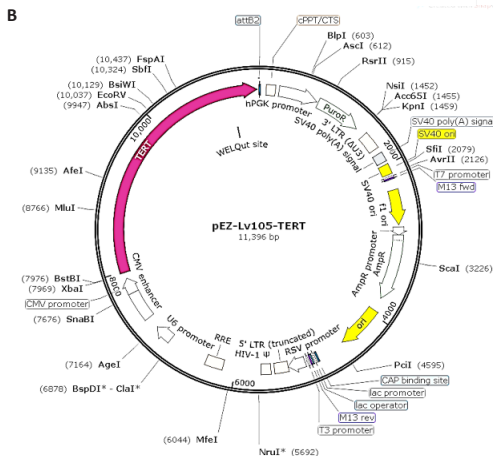
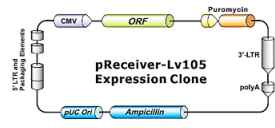
1.5 主要观察指标 ① α -SMA、FSP-1、PDGFR β 免疫荧光染色；② 细胞增殖能力；③ β -半乳糖苷酶染色结果；④ 染色体核型。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件 (SPSS Inc., Chicago, IL) 和 GraphPad Prism 8.0 进行数据统计学分析和图片处理，采用 student t 检验分析组间差异性， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

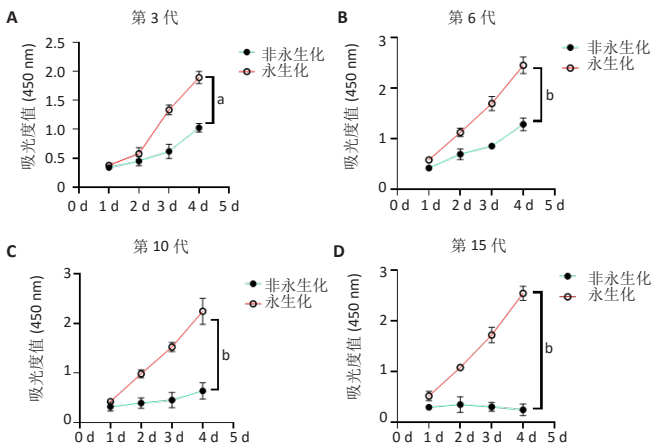
2.1 口腔癌相关成纤维细胞的分离与鉴定结果 新鲜的口腔鳞癌组织标本，经酶解消化法处理并培养 2 d 后，可见有梭形成纤维样细胞存在；培养三四天后可见大量成纤维细胞增殖。将爬出的成纤维细胞进一步培养，利用包装有人端粒酶反转录酶 (pBabe-hygro-hTERT) 的慢病毒感染已经分离得到的原代肿瘤相关成纤维细胞，见图 1A, B。采用免疫荧光对非永生化和永生化成纤维细胞进行 α -SMA、FSP-1 以及 PDGFR β 染色，见图 1C, D，明确了永生肿瘤相关成纤维细胞系的建立。

A OmicsLink™ Expression Clone (CMV Promoter)



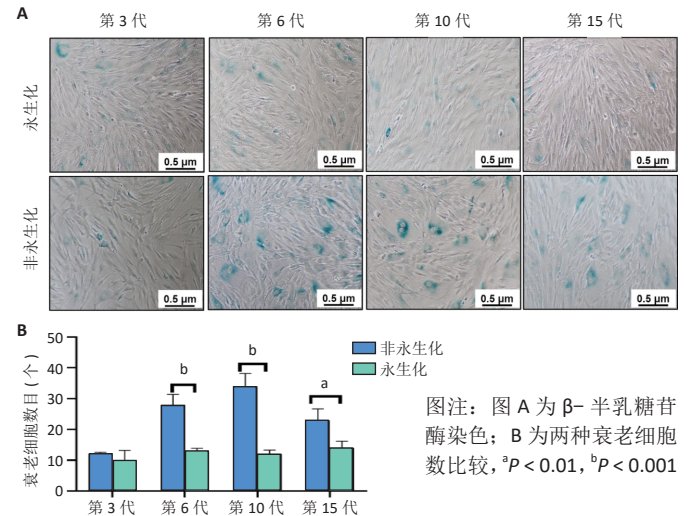
图注：图 A 为永生化疗毒构建；B 为质粒信息；C, D 为免疫荧光对非永生化和永生化成纤维细胞进行 α -SMA、FSP-1 以及 PDGFR β 染色
图 1 | 永生化和非永生化和纤维细胞的鉴定
Figure 1 | Identification of immortalized and non-immortalized oral cancer-associated fibroblasts

2.2 永生化和非永生化和纤维细胞生长曲线对比
 采用 CCK-8 实验检测第 3, 6, 10, 15 代永生化和非永生化和纤维细胞的生长曲线, 连续观察 4 d, 结果显示永生化和纤维细胞增殖速率明显优于非永生化和纤维细胞。随着细胞代数增加, 非永生化和纤维细胞的增殖速率明显下降, 而永生化和纤维细胞的增殖速率未受细胞代数的影响, 见图 2。



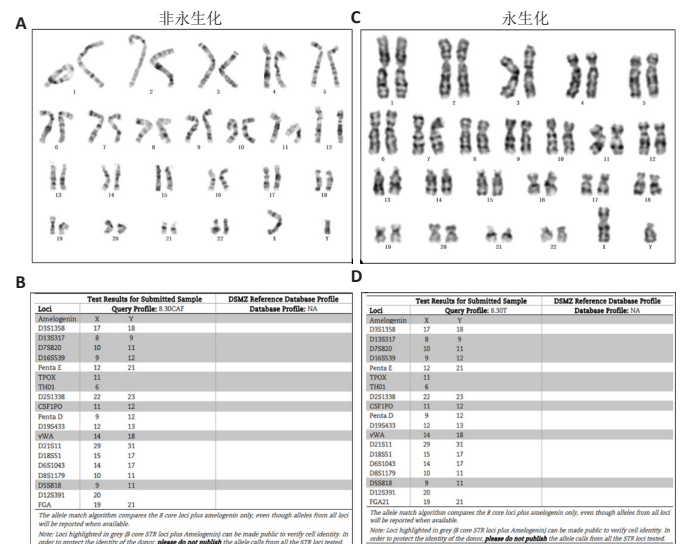
图注：图 A-D 分别为第 3, 6, 10, 15 代永生化和非永生化和纤维细胞的生长曲线, $^aP < 0.01$, $^bP < 0.001$
图 2 | 永生化和非永生化和纤维细胞生长曲线对比
Figure 2 | Comparison of growth curves of immortalized and non-immortalized oral cancer-associated fibroblasts

2.3 永生化和非永生化和纤维细胞衰老对比
 在相同培养条件下同时培养永生化和非永生化和纤维细胞, 对第 3, 6, 10, 15 代永生化和非永生化和纤维细胞进行 β -半乳糖苷酶染色, 在 37 °C 培养箱内进行过夜培养, 显微镜下观察发现随着细胞代数的增加, 衰老的永生化和纤维细胞显著少于非永生化和纤维细胞, 见图 3。



图注：图 A 为 β -半乳糖苷酶染色；B 为两种衰老细胞数比较, $^aP < 0.01$, $^bP < 0.001$
图 3 | 永生化和非永生化和纤维细胞衰老对比
Figure 3 | Comparison of senescence of immortalized and non-immortalized oral cancer-associated fibroblasts

2.4 永生化和非永生化和纤维细胞的染色体核型鉴定
 镜下观察发现, 永生化和纤维细胞染色体核型仍保留正常细胞的基本特征, 而未发生恶性转化, 见图 4A, B。此外, 短串联重复序列检测结果显示, 两株细胞均为原代细胞, 与已知细胞数据库信息均无重合, 见图 4C, D。



图注：图 A, C 为非永生化和永生化和纤维细胞的染色体核型；B, D 为非永生化和永生化和纤维细胞的染色体位点信息
图 4 | 永生化和非永生化和纤维细胞染色体核型鉴定
Figure 4 | Chromosomal karyotype identification of immortalized and non-immortalized oral cancer-associated fibroblasts

3 讨论 Discussion

肿瘤基质与肿瘤的起始、进展和转移密切相关，主要包括间充质来源的基质细胞，如癌症相关成纤维细胞和细胞外基质^[22]。细胞外基质是影响治疗效果的主要因素，被认为是肿瘤微环境中免疫抑制的关键因素^[23]。肿瘤相关成纤维细胞不仅为癌细胞提供机械支持，而且通过调节肿瘤免疫、肿瘤微环境代谢重新编程、细胞外基质重塑和收缩以及诱导治疗耐药等多种现象参与调控癌细胞的增殖、存活、转移和治疗的耐药性^[24-25]。肿瘤相关成纤维细胞在口腔鳞状细胞癌组织中分布广泛，主要集中在癌巢间质和前沿区域，具有较高肿瘤相关成纤维细胞比例的口腔鳞状细胞癌患者，其生存率较低，但其生物学机制还需进一步明确。目前，研究发现口腔鳞状细胞癌中肿瘤相关成纤维细胞可分泌肿瘤坏死因子 α 和基质细胞衍生因子(SDF1/CXCL12)，通过SDF-1/CXCR4信号轴促进人脐静脉内皮细胞侵袭性及新生血管形成^[26]。作者所在团队也发现，肿瘤相关成纤维细胞中高度表达一种新的长链非编码RNA并命名为Lnc-CAF，Lnc-CAF/IL-33信号通路可诱导正常成纤维细胞转化为肿瘤相关成纤维细胞，敲除Lnc-CAF显著抑制了肿瘤细胞生长，并且组织中Ki-67表达降低^[16]。因此，探究肿瘤相关成纤维细胞在口腔鳞状细胞癌生长、转移和免疫治疗中的作用是头颈癌研究领域的热点方向，但是目前实验研究过程中还缺乏能够稳定传代的肿瘤相关成纤维细胞系。

正常细胞在体外培养一段时间后，细胞便会失去生长、分裂的能力而走向衰老和死亡^[27]。细胞系是生物学研究的重要工具，一般的建立方法是从生物体的离体组织中分离培养出细胞，并加以改造形成稳定的细胞系^[21]。因此，使目的细胞在体外永生成为众多研究的重点^[28]，例如有研究建立了肾癌的内皮细胞系，为探索肾癌血管新生领域提供实验材料^[29]。在该研究中，将人端粒酶反转录酶感染口腔鳞癌原代成纤维细胞建立了正常表型的肿瘤相关成纤维细胞永生细胞系，永生肿瘤相关成纤维细胞能够不受传代次数的限制，CCK-8实验证实该细胞系能够一直稳定传代，并且增殖能力没有明显衰退。相比之下，原代肿瘤相关成纤维细胞在增殖8-10代时就已经出现增殖能力下降的问题。其他文献也证实永生细胞能够通过外界因素使细胞不断分裂增殖而达到永生化的状态，具有多次传代的特性，能够无限增殖、无表型变化，具有克隆性与均一性，能够使那些难以传代、增殖缓慢、易衰老的细胞获得永生化的特性，有利于毒理、致病机制、细胞移植、组织工程等方面的研究^[30]。

对口腔鳞癌的基础与临床研究而言，建立肿瘤相关成纤维细胞系是肿瘤相关成纤维细胞与肿瘤交互作用研究中至关重要的环节，而国内目前尚缺乏成熟的口腔鳞癌相关成纤维细胞系^[31]。肿瘤相关成纤维细胞的体外建系主要面临三大问题：一是原代细胞在培养过程中容易出现衰老，很难进行长期的连续传代；二是要严格控制肿瘤细胞的生长；三是要预

防经常发生的细菌、霉菌以及支原体等污染^[32-33]。在肺癌研究中，有研究人员成功建立了肺癌相关成纤维细胞的永生细胞系，该细胞能够在体外稳定传代，为肺癌的间质细胞研究提供基础^[34]。该研究建立的永生肿瘤相关成纤维细胞在连续传代过程中，没有出现显著的细胞衰老，活力能够有效保持，有助于进一步探讨肿瘤相关成纤维细胞与口腔鳞癌细胞的交互作用机制。此外，肿瘤微环境中的肿瘤相关成纤维细胞具有表型和功能的异质性，这意味着肿瘤相关成纤维细胞的特殊亚群在肿瘤进展和治疗反应中的作用迥异。该研究获得单细胞背景来源的肿瘤相关成纤维细胞克隆，将非常有效地用于探究肿瘤相关成纤维细胞在局部微环境中对肿瘤细胞的独特作用。

综上所述，该研究通过原代培养和细胞永生技术成功建立了口腔癌来源的永生成纤维细胞系，且永生化的成纤维细胞染色体无异常变化，表型和增殖能力稳定，该细胞系的建立为口腔癌肿瘤微环境的研究提供进一步的实验基础。

作者贡献：实验设计为陈盛、杨艳、丁亮；实验实施为陈盛、叶传进、张磊、夏舒、李慧玲；实验评估黄晓峰。

经费支持：该文章接受了“国家青年科学基金项目(81902754)”和“江苏省自然科学基金(BK20190304)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：该研究的实施符合南京市口腔医院的相关伦理要求，医院伦理批件号：No.2019NL-009(KS)。

知情同意问题：口腔癌组织由南京市口腔医院提供，均经当事人知情同意并签订协议书。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明：文章统计学方法已经通过南京大学统计学专家范怡梅审核。

文章版权：文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] PATEL SG, AMIT M, YEN TC, et al. Lymph node density in oral cavity cancer: results of the International Consortium for Outcomes Research. *Br J Cancer*. 2013;109(8):2087-2095.
- [2] ÖZDEMİR BC, PENTCHEVA-HOANG T, CARSTENS JL, et al. Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival. *Cancer Cell*. 2015;28(6):831-833.
- [3] DOMEN A, QUATANNENS D, ZANIVAN S, et al. Cancer-Associated Fibroblasts as a Common Orchestrator of Therapy Resistance in Lung and Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(5):987.

- [4] ZHANG F, CUI JY, GAO HF, et al. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition and cisplatin resistance in ovarian cancer via CXCL12/CXCR4 axis. *Future Oncol.* 2020;16(32):2619-2633.
- [5] DOTTO GP. Multifocal epithelial tumors and field cancerization: stroma as a primary determinant. *J Clin Invest.* 2014;124(4):1446-1453.
- [6] BALDI L, HACKER DL, ADAM M, et al. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnol Lett.* 2007;29(5):677-684.
- [7] DAUER P, ZHAO X, GUPTA VK, et al. Inactivation of Cancer-Associated-Fibroblasts Disrupts Oncogenic Signaling in Pancreatic Cancer Cells and Promotes Its Regression. *Cancer Res.* 2018;78(5):1321-1333.
- [8] YI Y, ZENG S, WANG Z, et al. Cancer-associated fibroblasts promote epithelial-mesenchymal transition and EGFR-TKI resistance of non-small cell lung cancers via HGF/IGF-1/ANXA2 signaling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(3):793-803.
- [9] LIU M, SONG W, HUANG L. Drug delivery systems targeting tumor-associated fibroblasts for cancer immunotherapy. *Cancer Lett.* 2019; 448:31-39.
- [10] GRUNBERG N, PEVSNER-FISCHER M, GOSHEN-LAGO T, et al. Cancer-Associated Fibroblasts Promote Aggressive Gastric Cancer Phenotypes via Heat Shock Factor 1-Mediated Secretion of Extracellular Vesicles. *Cancer Res.* 2021;81(7):1639-1653.
- [11] BAKER AT, ABUWARWAR MH, POLY L, et al. Cancer-Associated Fibroblasts and T Cells: From Mechanisms to Outcomes. *J Immunol.* 2021;206(2):310-320.
- [12] SUBRAMANIAM KS, OMAR IS, KWONG SC, et al. Cancer-associated fibroblasts promote endometrial cancer growth via activation of interleukin-6/STAT-3/c-Myc pathway. *Am J Cancer Res.* 2016;6(2): 200-213.
- [13] BORRIELLO L, NAKATA R, SHEARD MA, et al. Cancer-Associated Fibroblasts Share Characteristics and Protumorigenic Activity with Mesenchymal Stromal Cells. *Cancer Res.* 2017;77(18):5142-5157.
- [14] LI Z, ZHOU J, ZHANG J, et al. Cancer-associated fibroblasts promote PD-L1 expression in mice cancer cells via secreting CXCL5. *Int J Cancer.* 2019;145(7):1946-1957.
- [15] ZHAO X, DING L, LU Z, et al. Diminished CD68+ Cancer-Associated Fibroblast Subset Induces Regulatory T-Cell (Treg) Infiltration and Predicts Poor Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *Am J Pathol.* 2020;190(4):886-899.
- [16] DING L, REN J, ZHANG D, et al. A novel stromal lncRNA signature reprograms fibroblasts to promote the growth of oral squamous cell carcinoma via lncRNA-CAF/interleukin-33. *Carcinogenesis.* 2018;39(3): 397-406.
- [17] ZELTZ C, PRIMAC I, ERUSAPPAN P, et al. Cancer-associated fibroblasts in desmoplastic tumors: emerging role of integrins. *Semin Cancer Biol.* 2020;62:166-181.
- [18] TAN JJ, WANG L, MO TT, et al. Establishment of immortalized laryngeal epithelial cells transfected with Bmi1. *Cell Transplant.* 2020; 29:963689720908198.
- [19] KAMADA M, KUMAZAKI T, MATSUO T, et al. Establishment of ultra long-lived cell lines by transfection of TERT into normal human fibroblast TIG-1 and their characterization. *Cell Biol Int.* 2012;36(6):519-527.
- [20] YOU S, MOON JH, KIM TK, et al. Cellular characteristics of primary and immortal canine embryonic fibroblast cells. *Exp Mol Med.* 2004; 36(4):325-335.
- [21] PETKOV S, KAHLAND T, SHOMRONI O, et al. Immortalization of common marmoset monkey fibroblasts by piggyBac transposition of hTERT. *PLoS One.* 2018;13(9):e0204580.
- [22] VERED M, DAYAN D, YAHALOM R, et al. Cancer-associated fibroblasts and epithelial-mesenchymal transition in metastatic oral tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2010;127(6):1356-1362.
- [23] MARSH D, SUCHAK K, MOUTASIM KA, et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. *J Pathol.* 2011; 223(4):470-481.
- [24] THOMAS D, RADHAKRISHNAN P. Tumor-stromal crosstalk in pancreatic cancer and tissue fibrosis. *Mol Cancer.* 2019;18(1):14.
- [25] BARRETT R, PURÉ E. Cancer-associated fibroblasts: key determinants of tumor immunity and immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2020;64: 80-87.
- [26] KOBAYASHI H, ENOMOTO A, WOODS SL, et al. Cancer-associated fibroblasts in gastrointestinal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(5):282-295.
- [27] WU Y, ZHANG Y, MISHRA A, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from newborn marmoset skin fibroblasts. *Stem Cell Res.* 2010;4(3):180-188.
- [28] LI Q, TANG L, ROBERTS PC, et al. Interferon regulatory factors IRF5 and IRF7 inhibit growth and induce senescence in immortal Li-Fraumeni fibroblasts. *Mol Cancer Res.* 2008;6(5):770-784.
- [29] MAISHI N, KIKUCHI H, SATO M, et al. Development of immortalized human tumor endothelial cells from renal cancer. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(18):4595.
- [30] BALDUCCI L, BLASI A, SALDARELLI M, et al. Immortalization of human adipose-derived stromal cells: production of cell lines with high growth rate, mesenchymal marker expression and capability to secrete high levels of angiogenic factors. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(3):63.
- [31] VIDALE P, MAGNANI E, NERGADZE SG, et al. The catalytic and the RNA subunits of human telomerase are required to immortalize equid primary fibroblasts. *Chromosoma.* 2012;121(5):475-488.
- [32] KUMAZAKI T, KURATA S, MATSUO T, et al. Establishment of human induced pluripotent stem cell lines from normal fibroblast TIG-1. *Hum Cell.* 2011;24(2):96-103.
- [33] YUAN J, YANG BM, ZHONG ZH, et al. Upregulation of survivin during immortalization of nontransformed human fibroblasts transduced with telomerase reverse transcriptase. *Oncogene.* 2009;28(29):2678-2689.
- [34] HASHIMOTO H, SUDA Y, MIYASHITA T, et al. A novel method to generate single-cell-derived cancer-associated fibroblast clones. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2017;143(8):1409-1419.

(责任编辑: MZH, ZN, ZH)